

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504561

(43) 公表日 平成8年(1996)5月21日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	片内整理番号	P I
C 1 2 P 21/92	C	9282-4B	
C 0 7 K 14/79		8318-4H	
C 1 2 N 1/19		8828-4B	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00 A
		7729-4B	5/00 A
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平5-519314	(71) 出願人	ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン アメリカ合衆国77030デキサス、ヒュース トン、ワン・ベイラー・プラザ (番地の表 示なし)
(36) (22) 出願日	平成5年(1993)4月16日	(72) 発明者	コニーリー、オーラ・エム アメリカ合衆国77025デキサス、ヒュース トン、ナンバー1907、サウス・ブレイスウ ッド2801番
(35) 審判文提出日	平成6年(1994)10月24日	(72) 発明者	ヘドン、デニス・アール アイルランド、ゴールウェイ、ダンガン・ ローワー、アグナクラ、リシン (番地の表 示なし)
(36) 国際出願番号	PCT/US93/03614	(74) 代理人	弁理士 青山 茂 (外1名) 最終頁に続く
(37) 国際公開番号	WO93/22348		
(37) 国際公開日	平成5年(1993)11月11日		
(31) 優先権主張番号	07/873,304		
(32) 優先日	1992年4月24日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 組織えヒトラクトフェリンの製造

(57) 【要約】

本発明は、新規プラスミド、トランスフェクションした真核細胞、およびこれらプラスミドおよびトランスフェクションした真核細胞の製造方法を提供する。該新規プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするcDNAを含有する。アスペルギルス・オリゼーにおけるヒトラクトフェリンタンパク質の製造方法も提供される。それゆえ、本発明は、組織えヒトラクトフェリンの効率的かつ経済的な製造方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を連結し、該配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで真核細胞を形質転換すること特徴とする、生物学的に活性な組織内ラクトフェリンの製造方法。

2. 該選択マーカー遺伝子がpyr4、pyrG、andS、argBおよびhrrCよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。

3. 該細胞がラクトフェリンを発現する請求項1に記載の方法。

4. 請求項2に記載の方法により製造されたラクトフェリン。

5. 該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。

6. 該転写停止配列が、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。

7. 該リンカー配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびラクトフェリンよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。

8. 図6記載のcDNAおよび真核細胞中で該cDNAを発現させるのに必要な制御要素からなる、真核細胞中での発現に適合されたプラスミド。

9. pAhLFGであるプラスミド。

10. 請求項8に記載のプラスミドを含む真核細胞。

11. 該真核細胞が真菌細胞および昆虫細胞よりなる群から選ばれたものである請求項10に記載の真核細胞。

12. 該昆虫細胞がSF9である請求項11に記載の真核細胞。

13. 該真菌細胞が酵母である請求項11に記載の真核細胞。

14. 該酵母細胞がアスベルギルスである請求項13に記載の真核細胞。

15. 該アスベルギルス株がアスベルギルス・オリゼー、アスベルギルス・ニガー、アスベルギルス・ニデュランスおよびアスベルギルス・アワモリよりなる群から選ばれたものである請求項14に記載の真核細胞。

16. ラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む組換えプラスミドを含有する形質転換体真核細胞を、ラクトフェリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地中で培養し、ついで該ヒトラクトフェリンを単離することを特徴とする、ラクトフェリンの製造方法。

17. (1) 遺伝子発現において制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素、(2) ヒトラクトフェリンをコードするcDNA、および(3) 適当な転写および翻訳開始および停止配列の集合からなる転写単位を有する組換え発現ベクター。

18. 該遺伝子要素がプロモーターである請求項17に記載のベクター。

19. 該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項18に記載のベクター。

20. 該転写停止配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項17に記載のベクター。

21. 請求項16に記載の方法によるタンパク質生成物。

【発明の詳細な説明】

組換えヒトラクトフェリンの製造

発明の背景

発明の技術分野

本発明は一般に鉄結合性糖タンパク質の分野に関する。さらに詳しくは、本発明はヒトラクトフェリンの組換え製造に関する。

関連技術の記載

ヒトラクトフェリン(LF)は、鉄結合性モノマー糖タンパク質のトランスフェリンファミリーの一員である。ヒトラクトフェリンは最初に乳中で発見され、初乳では7グラム/リットルのレベルまで達することがある。LFは以来、涙、唾液および粘膜分泌液などの他の外液中で検出されており、多形核白血球の二次顆粒中でも検出されている。

LFは、C末端半分とN末端半分とで高い相同性を有する2葉性構造を有する78kDaの糖タンパク質であり、該相同性はアミノ酸および3次元構造の両レベルで明らかである。これら各葉構造は一つの鉄(III)イオンと高い親和性で可逆的に結合することができ、それと同時に重炭酸塩も結合する。ラクトフェリンに対して提唱されている生物学的機能としては、微生物感染に対する防御、幼児における腸内での鉄吸収の増進、細胞増殖の促進、骨髄造血の制御および炎症応答の修飾が挙げられる。

細胞外糖タンパク質の工業的生産において、糸状菌は宿主として首尾よく使用されている。ある種の工業的株は、これらタンパク質をグラム量で分泌することができる。加えて糸状菌は真核性タンパク質の翻訳後修飾を正確に行うことができ、多くの株は米国食品医薬品局の認可を得ている。さらに、大スケールの発酵技術および下流アロッシング経験(downstream processing experience)を利用することができる。

現在のところ、ヒトLFを製造するための効率的かつ経済的な方法は存在しない。従って、栄養学的および治療学的適用さらに作用メカニズムのさらなる探求のためのヒトラクトフェリンの効率的製造方法の開発により、長い間の懸念であ

た必要性和当該技術分野における記載が達成されるであろう。

発明の要約

一つの態様において、本発明は、ヒトラクトフェリンのcDNAを含む組換えプラスミドを提供する。本発明のプラスミドは、真核細胞中での発現用に適応されており、該真核細胞中でヒトラクトフェリンcDNAを発現するのに必要な制御要素を含む。

他の態様において、本発明は、組換えプラスミドを包含する形質転換した真核細胞を提供する。真核細胞は、アスペルギルス(Aspergillus)を含む一群の糸状菌から選択される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチド断片を挿入したプラスミドベクターを含む。

本発明のさらに他の態様において、組換えプラスミドを含む形質転換した真核細胞を培養することを包含する、組換えヒトラクトフェリンの製造法が提供される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む。ヒトラクトフェリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地中で培養した後、ヒトラクトフェリンタンパク質を単離する。

本発明のさらに別の態様において、組換え発現ベクターが提供される。このベクターは、(1)遺伝子発現における制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素；(2)ヒトラクトフェリンをコードするcDNA；(3)適当な転写および翻訳開始および停止配列；および(4)該ベクターで形質転換されたアスペルギルス胞子の選択のための遺伝子要素の集合からなる転写単位を包含する。

本発明のさらに別の態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリンの製造方法が提供される。該方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を合成し、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成し、該プラスミドを制限エンドヌクレアゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現するプラスミドで真核細胞を形質転換することからなる。

図面の簡単な記載

上記本発明の特徴、利点および目的並びにこれから明らかになるであろう他の特徴、利点および目的が得られさらに詳細に理解され得るように、上記で簡単に要約した発明の一層詳細な記載を、添付の図面で説明するある種の態様を参照しながら行う。これら図面は本明細書の一部を構成する。しかしながら、添付の図面は本発明の好ましい態様を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものでないことに注意すべきである。本発明は、他の同様に有効な等価な態様を包含する。

図1は、アスペルギルス・オリゼー (*aspergillus oryzae*) 発現プラスミド、pAhl1fgの模式図を示す。

図2は、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株のサザンブロット分析を示す。

図3は、形質転換体とコントロールA07とのRNA分析を示す。

図4は、組換えLF分泌および精製の銀染色SDS-アクリルアミドゲル分析を示す。

図5は、ヒト組換えLFの特徴付けを示す。

図6は、ヒトラクトフェリンのcDNA配列を示す。

発明の詳細な記載

定義

本出願の目的のため、「トランスフェリンファミリー」なる語は、血清トランスフェリン、卵トランスフェリンおよびラクトフェリンを含む鉄輸送タンパク質のファミリーを意味する。これらタンパク質はすべて構造的に関連している。

本出願の目的のため、「ベクター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの挿入、伝播および発現を可能とするプラスミドベヒクルを意味する。

本出願の目的のため、「宿主」なる語は、そのゲノム中にラクトフェリン発現プラスミドの組み込みを可能とするすべての真核細胞を意味する。

本出願の目的のため、「プロモーター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの転写を制御する制御DNA配列を意味する。

本出願の目的のため、「マルチクローニングカセット」なる語は、種々の

○DNAの挿入を可能とする種々の酵素のための制限酵素認識部位を含むDNA断片を意味する。

本出願の目的のため、「形質転換」なる語は、当該真核細胞によるプラスミドの取り込みを意味する。

本出願の目的のため、「鉄結合能」なる語は、 ^{56}Fe に結合する能力を意味する。完全に機能性のラクトフェリンは、1分子のLP当たり2原子の鉄と結合することができる。

本出願の目的のため、「生物学的活性」「生物学的に活性」なる語は、鉄への結合能によって測定されるラクトフェリンの生物学的活性を意味する。ラクトフェリンタンパク質は鉄の輸送タンパク質として機能し、生物学的に活性であるためには鉄に結合する必要がある。

本明細書において引用する文献はすべて、参照のため本明細書に引用する。

以下に挙げる実施例は本発明の種々の態様を説明するためのものであり、いかなる形であれ本発明を限定することを意図するものではない。

実施例1

真菌株および形質転換

これら研究において使用するpyrG変異株は、アスペルギルス・オリゼー(A07 11488)に由来するものであった。アスペルギルス・オリゼーからのpyrG遺伝子を4-ニトロキノリン-1-オキシドで変異させた。このアスペルギルスの形質転換は、オスマニ(Osmani)らの手順(J. Cell Biol. 104:1495~1504(1987))の修飾により行った。5mMウラシルおよび10mMウリジンを含有するYG培地(0.5%酵母エキス、2%グルコース)(50ml)中に分生子($1 \times 10^6/\text{ml}$)を接種した。菌の管状物が目に見えるようになるまで、32℃にて14~16時間増殖させた。発芽した分生子を遠心分離により回収し、0.4M硫酸アンモニウム、50mMクエン酸カリウム(pH6.0)、0.5%酵母エキス、0.12gノボザイム(novozyne)、0.1gトリセラーゼ(Prisecase)、100μlβ-グルクロニダーゼ、0.5%ショ糖および10mM MgSO₄を含有する溶解混合物(40ml)中に再懸

濁した。32℃、150rpmにて2〜3時間、プロトプラスト化を行った。プロトプラスト化の後、未消化の菌糸体を除去するために、滅菌ミラクロス (miracloth) を用いた濾過が必要であった。プロトプラストを遠心分離により回収し、10mlの0.4M硫酸アンモニウム、1%ショ糖および50mMクエン酸カリウム (pH6.0) で4℃にて2回洗浄し、1mlの0.6M KCl; 50mM CaCl₂; 10mMトリス-HCl (pH7.5) 中に再懸濁し、氷上に置いた。プロトプラスト調製の直後に形質転換を行った。プロトプラストのアリコート (100μl) を、3μgのDNAおよび50μlの40%ポリエチレングリコール (PEG) 6000、50mM CaCl₂、0.6M KClおよび10mMトリス-HCl (pH7.5) に加えた。試料を氷上で15分間インキュベートし、その後、PEG溶液をさらに1ml加え、室温でのインキュベーションを30分間続けた。この混合物のアリコートを、0.4%硫酸アンモニウムを添加した0.7%最小培地 (3ml) 中、同じ成分を含有する2%アガーで固化したプレート上にプレーティングした。その後の増殖はすべて32℃で行った。

実施例2

プラスミドの構築

発現プラスミドの模式図を図1に示す。ヒトLFをコードする完全cDNAをDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて修復し、AccI消化し修復したpGEM4中にサブクローニングしてpGEMhLFCを得た。LFシグナル配列を除去しα-アミラーゼ配列とインフレーションにある5'末端を生成させるため、pGEMhLFCプラスミドDNAの複製連鎖反応 (PCR) 増幅により、HindII/AccI末端を含有する252塩基対のラクトフェリン断片 (69〜321番目) を得た。使用したオリゴプライマーは以下の通りであった。SEQ ID NO1に示す5'末端オリゴヌクレオチド:

(CTGGGTCGACGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGTGGTGC)

およびSEQ ID NO2に示す3'末端オリゴヌクレオチド:

(GCCGTAGACTTCGCCGCTACAAG)

このPCR断片をHindIIおよびAccIで消化し、HindII/AccI

消化した pGEMhLFC 中にサブクローニングして pGEMhLF を生成した。プロモーター、シグナル配列および成熟 α -アミラーゼ II 遺伝子の開始部からのアラニン残基をコードする Asp 718 / PvuII 末端を有する 681 塩基対の α -アミラーゼ断片を、アスベルギルス・オリゼーのゲノム DNA の PCR 増幅により得た。オリゴプライマーは以下の通りであった。SEQ ID NO 3 に示す 5' 末端オリゴヌクレオチド:

(GAGGTACCGAATTCATGGTGTITTTGATCATTTTAAATTTTAT)

および SEQ ID NO 4 に示す 3' 末端オリゴヌクレオチド:

(AGCAGCTGCAGCCAAAGCAGGTGCCGCGACCTGAAGGCCGTACAG)

増幅した DNA を Asp 718 および PvuII で消化し、Asp 718 / Hind III 消化した pGEMhLFC 中にサブクローニングした。得られたプラスミド (pGEMAhLF) を EcoRI で消化し、得られた 2、8 kb α -アミラーゼラクトフェリン断片を、pAhLF* を生成するための方法に従って pAL3 中の唯一の EcoRI 部位にサブクローニングした。pAhLF* で失われたラクトフェリンの最後の 5 つのカルボキシ末端コドン (2138 ~ 2153 番目) を提供するため、およびアスベルギルス・ニガールのグルコアミラーゼ遺伝子からの 3' 非翻訳配列の最初の 180 塩基対を提供するため、合成オリゴヌクレオチドを用いた。得られたプラスミド (pAhLFG) を用いてアスベルギルス・オリゼー pvrG 変異株を形質転換させた。

図 1 を参照すると、アスベルギルス・オリゼー発現プラスミド pAhLFG は、アスベルギルス・オリゼー AMY 11 遺伝子の 5' - フランキング配列の 681 塩基対 (シグナル配列および成熟 α -アミラーゼの最初のコドンを含む) を含む。これら配列から下流にインフレームで成熟ヒトラクトフェリンをコードする cDNA をサブクローニングして、増殖培地にデンプンを添加することによって組織タンパク質の産生を可能にする。アスベルギルス・ニガールのグルコアミラーゼ 3' 非翻訳領域は、転写ターミネーターおよびポリアダニル化シグナルを提供する。このプラスミドはまた、ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa)) pyr4 選択マーカーおよびアンピシリン耐性遺伝子をも含有する。

ヒトLFの発現に用いるプラスミド構築物 (pA h L F G) は、アスペルギルス・オリゼー α -アミラーゼII遺伝子 (AMY11) のプロモーターおよび分泌シグナルペプチドをコードする681塩基対断片を含有する。シグナル配列はまた、 α -アミラーゼ成熟タンパク質の開始部からのアラニンのコドンを含み、エンドゲナーゼである α -アミラーゼペプチダーゼにより認識され得るシグナル配列開裂部位 (Leu Ala Ala) を生成する。成熟タンパク質をコードするヒトラクトフェリンcDNA断片をAMY11配列のすぐ下流にインフレームでサブクローニングし、この高度に効率的なデンアイン誘導性プロモーターの制御下に置いた。転写されたヒトLF mRNAを安定化させるため、アスペルギルス・ニガールからのグルコアミラーゼ遺伝子の3' 非翻訳領域をコードする180塩基対断片を、ヒトLF cDNAのすぐ下流のマルチブルクローニングカセット中の唯一のBamHI部位中にライゲートして、転写ターミネーターおよびポリアダニル化シグナルを提供した。このプラスミドにはまた、アスペルギルス・オリゼーのpyrG栄養要求性変異を補償するニューロスボラ・クラッサPyr4選択マーカーも含まれ、ウリジンの不在下で増殖させることによってプラスミドで形質転換された胞子の選択を可能としている。

実施例3

ゲノムDNAの操作

アスペルギルス・オリゼーのDNAの単離は、ラフムッセン (Rafnussen) らのJ. Biol. Chem., 265:13767~13775 (1990) に記載された方法に従い、凍結乾燥した菌糸体 (200mg) から行った。このDNAをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル上でサイズ分離し、ニトロセルロースに移した。サザン分析のためのニトロセルロースフィルターのプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、6×SSC、0.1% SDSおよび0.5% 粉乳中、65℃で16時間行った。ハイブリダイゼーション溶液には 1×10^7 cpmの³²P-標識ラクトフェリンcDNAプローブ (2.1 kb) が含まれていた。フィルターを2×SSC、0.5% SDS中、室温にて30分間洗浄し、ついで0.5×SSC、0.5% SDS中、68℃で30分間、

2回洗浄した。フィルターを乾燥させ、 -70°C で2時間感光させ、オートラジオグラフィにより現像した。

図2を参照すると、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株に対してサザンブロット分析を行った。個々の形質転換体およびコントロールAO7からのゲノムDNAを放射性標識hLF cDNAプローブ(2.1kb)とハイブリダイズさせた。矢印は、発現プラスミドのEcoRI消化によって生成する放射性銀銀断片(2.8kb)を示し、これはすべての形質転換体(1~9)には存在するがコントロールの非形質転換AO7には存在しない。バクテリオファージラムダHindIII断片の分子量を左側に示す。

実施例4

ノーザン分析

市販のRNazoid(ビオキシテック・ラボトリーズ、ヒューストン、テキサス州)を用い、製造業者の指示に従ってRNAを凍結乾燥菌糸体(200mg)から単離した。2.2Mホルムアルデヒドを含有する0.8%アガロースゲル中で全RNA(20 μg)を電気泳動にかけた。RNAをニトロセルロースに移し、2.1kbのラクトフェリンcDNAまたは α -アミラーゼ11遺伝子のコード領域に対応する1.8kbのゲノム α -アミラーゼ断片のいずれかとハイブリダイズさせた。プローブをニックトランスレーションにより ^{32}P -標識した(比活性: $2 \times 10^5 \text{ cpm}/\mu\text{g}$)。ハイブリダイゼーションを、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.05%粉乳中、65 $^{\circ}\text{C}$ にて氷上、 $2 \times 10^5 \text{ cpm}$ プローブ/mlで行った。

洗浄はサザン分析に用いたものと同じであった。フィルターを乾燥させ、 -70°C にて2時間感光させ、オートラジオグラフィにより現像した。ニトロセルロース膜およびマニホルド(manifold)ドットシステムを用いてRNAドットプロットを行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件はサザン分析に記載したものと同様であった。放射能をベタゴン(betagon)プロットアナライザーを用いて定量した。

ラクトフェリンタンパク質の組換え産生をその好ましい態様において記載した。しかしながら、サッカロミセス・セレビシエ(saccharomyces cerevisiae)や

キア・パストルシス (*pichia pastoris*) などの真菌源または SF9 などの昆虫細胞などの他の多くの採取源で産生させることも可能である。

図3において、RNA分析を形質転換体とコントロールA07を比較して行った。パネルAでは、コントロールA07および形質転換体#1からのRNA (20 μ g) を放射性標識ヒトLF cDNAとハイブリダイズさせたノーザン分析を示す。ヒトLF mRNA (2.3 kb) が形質転換体#1では検出されたが、コントロールの非形質転換A07では検出されなかった。28Sおよび18SrRNAバンドの位置を左側に示す。パネルBでは、放射性標識 α -アミラーゼゲノムDNAプローブを用いた、コントロールA07および形質転換体#1からのRNA (5および10 μ g) のドットプロットを比較して示す。パネルCでは、放射性標識ヒトLF cDNAプローブを用いた、コントロールA07および形質転換体#1からのRNA (5および10 μ g) のドットプロットを比較して示す。

本発明の発現プラスミドの制御要素下でラクトフェリンmRNAがアスpergillus・オリゼー中で正確かつ効率的に転写されるか否かを決定するためにノーザン分析を行った。形質転換体#1からの胞子 (1×10^6 /ml) およびコントロールの非形質転換胞子を、炭素源として1.5%グルコースを含有する真菌培地中に接種し、小さなシェークフラスコ培地中、30℃にて48時間増殖させた。培養液を洗浄し、3%デンプンを含有する真菌培地中に再接種してヒトLF mRNAの転写を誘導した。24時間後、細胞を回収し、RNAを単離した。2.2Mホルムアルデヒドを含有する1.0%アガロースゲル上で全RNA (20 μ g) をサイズ分離し、ニトロセルロース上にブロッティングした。

ヒトラクトフェリンmRNAの検出は³²P標識したヒトLF cDNA (2.0 kb) プローブを用いて行った。ヒトLF放射性標識cDNAプローブとのハイブリダイゼーションは、形質転換体においてラクトフェリンmRNAに対する正確なサイズにて (2.3 kb) 特定の放射性標識バンドを検出したが、コントロールの非形質転換株では検出されなかった (図3A)。ドットアッセイによるmRNAレベルの定量は、コントロールのA07と形質転換体#1との間で匹敵

し得るレベルの内生 α -アミラーゼrRNAの発現を示した(図3B)。加えて、形質転換体#1では α -アミラーゼとヒトLF mRNAとで同様のレベルの発現が認められた(図3Bおよび3C)。

実施例5

ヒト組織えLFの精製

増殖培地からのLFの精製は、実質的にストウェル(Stowell)らのBiochem. J., 276:349~59(1991)の記載に従い、CMセファデックスC50を用いて行った。カラムを500mlの0.025MトリスHCl(pH7.5)、0.1M NaClで前以て平衡化した。該前以て平衡化したカラムに適用する前に培地のpHをpH7.4に調節した。カラムを平衡緩衝液(500ml)で洗浄し、ついで0.1~1.1M NaClの直線塩勾配により洗浄した。SDS/PAGEおよび銀染色を用い、フラクション(全部で7ml)をラクトフェリン含量および純度についてアッセイした。LFを含有するフラクションを0.025M トリスHCl、pH7.5/0.1 M NaClに対して透析し、凍結乾燥させた。

実施例6

ヒトLFの定量

本質的にヒルジャ(Vilja)らのJ. Immunol. Methods, 76:73~83(1985)の記載に従い、ELISAアッセイを用いて組織えラクトフェリンを定量した。非結合アビジン-ビオチンアッセイを用いて5ngのラクトフェリン感度が得られた。乳房乳から単離したヒトLF(シグマ)を標準として用いた。ビオチン化したヒトラクトフェリンIgGはジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、ウエストダロブ、ペンシルベニア州から得た。

実施例7

N末端の配列決定

製造業者の指示に従い(アブライド・バイオシステムズ)、精製ヒト組織えLF(5 μ g)をSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離させ、アロブロット

(Probiott) (ポリビニリデンジフルオリド型の膜)に移した。ヒトLFをクマシーブリアントブルー染色で検出し、脱染色した。このヒトLFのバンドを切り出し、蒸留H₂Oで十分に洗浄し、空気乾燥させた。ヒトLFの最初の10アミノ酸のN末端アミノ酸配列を、アブライド・バイオシステムズのバルス(Pulsed)-液相シーケンサー(モデル477A)を用いて自動エドマン分析法により決定した。

図4を参照すると、パネルAは、組換えヒトLF分泌および精製の銀染色SDS-ポリアクリルアミドゲル分析を示す。レーン1には乳房乳ヒトLF標準(500ng)が含まれる。レーン2および3には、それぞれ誘導コントロールA07および形質転換体#1からの増殖培地の試料(40μg)が含まれる。レーン4~8には、形質転換体#1の増殖培地からの組換えLFのCM-セファデックス精製により回収した溶出フラクション(それぞれ、#25、30、35、40および45)の100μlアリコートが含まれる。分子量マーカー(バイオラド・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州)の位置を左側に示す。サイズはキログルトンにて示す。パネルBは、ヒトLFに対して向けられた特異的ポリクローナル抗体を用い¹²⁵I-アブプロテインAで検出する、パネルAの記載と同じ2つの試料のウェスタンブロット分析を示す。パネルCは、組換えヒトLFの#6N末端アミノ酸配列を示す。組換えヒトLFをN末端から10の残基で配列決定したが、本発明の構築物においてアラニンが付加されてα-アミラーゼシグナル配列開裂部位を提供すること以外は乳房乳ヒトLFと同一である。

実施例8

脱糖付加

N-グリコシダーゼF(バーリンガー・マンハイム)を用いて脱糖付加を行った。ラクトフェリン(0.5μg)を含有するアスベルギルス・オリゼーの増殖培地を0.01%SDSの存在下、100℃にて3分間変性させた。ヒト乳からの標準LFも同様に処理した。その後、試料を氷上に5分間置いた。N-グリコシダーゼF反応を0.4Mリン酸ナトリウム(pH6.8):0.08%トリトン;0.1%β-メルカプトエタノールおよび1単位酵素中で行い、37℃で16時

間インキュベートした。ヒトラクトフェリンに対して特異的に向けられた Ig G を用いて P A G E およびウエスタン分析を行い、消化した試料の移動度の増加を検出した。

図5にヒト組換え L F の特徴付けを行った。パネル A はラクトフェリンの脱糖付加を示す。パネル A はラクトフェリンの脱糖付加を示す。ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的なポリクローナル抗体を用いて糖付加したラクトフェリンおよび脱糖付加したラクトフェリンのウエスタン分析を行い、検出は¹²⁵I-アプロテイン A で行った。第一のパネルには、N グリコシダーゼ F で処理していない (-) および処理した (+) 初乳ヒト L F (500 ng) が含まれる。第二のパネルには、N グリコシダーゼ F で処理していない (-) および処理した (+) 精製組換えヒト L F (500 ng) が含まれる。糖付加したヒト L F のサイズを矢印で示す。パネル B は、鉄結合能に関する組換えラクトフェリンの機能分析を示す。パネル A および B は、それぞれ、示した濃度における初乳ヒト L F および精製組換えヒト L F の2つの試料の⁵⁶Fe フィルター結合アッセイを示す。両パネルにおける第一のレーンには、陰性コントロールとして B S A (5 μg) が含まれる。

ラクトフェリンは、N-グリコシド結合により結合した2つのN-アセチルラクトアミン型のグリカンを含む。組換えラクトフェリンが正確に糖付加されるかどうかを決定するため、該タンパク質をN-グリコシダーゼ F で処理し、S D S-ポリアクリルアミド電気泳動上で分離し、ニトロセルロースに移し、ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的 Ig G を用いてアプロブした(図5A)。N-グリコシダーゼ F はグリコシルアミン結合において加水分解して、分子量の小さい炭水化物不含のペプチドを生成する。組換え L F をヒト乳から精製した L F と比較すると、N-グリコシダーゼ F 消化によって両タンパク質とも一緒に移動し、該組換えタンパク質が天然 L F と同じ糖付加パターンを有することが示唆された。

ラクトフェリンは、各亜状態が一つの F e²⁺ イオンと堅固だが可逆的に結合する能力を有する2葉性構造を有する。ラクトフェリンの鉄結合特性は、その機能

的役割にとって非常に重要である。アスペルギルス・オリゼーで発現され分泌された組換えヒトL Fが初乳ラクトフェリンと同様の鉄結合能を有するかどうかを試験するため、⁵⁶De マイクロフィルター結合アッセイを開発した。形質転換体#1の増殖培地から単離した精製ヒトラクトフェリンを0.1 Mクエン酸(pH 2.0)に対して透析してアポーヒトL Fを生成した。ヒト乳からの天然ラクトフェリンも同様に処理した。等容量の1 M重炭酸塩中のこれら試料に過剰の⁵⁶De (0.2 mCi)を加え、ついで37℃にて30分間インキュベートした。試料をニトロセルロース膜に適用し、重炭酸塩で数回洗浄した。オートラジオグラフィによりフィルターを視覚化し、バタゴンプロットアナライザーを用いてDe-結合を定量した。図5Bに示すように、試験したすべての濃度において組換えL Fおよび天然L Fの両方とも同様の鉄結合レベルを示した。これら結果は、鉄結合能において組換えヒトL Fが天然ヒトL Fと識別できないことを示している。

図6において、ヒトラクトフェリントランバク質の全cDNA配列を示す。ラクトフェリンをコードするcDNAは、プラスミドを生成し、真核細胞を形質転換し、ラクトフェリントランバク質を製造するために用いる。

本発明において使用するアスペルギルスの株は、欠損 $pry4$ 遺伝子を含むためオロチジン⁵リン酸(OMP)デカルボキシラーゼを合成することができない栄養要求変異株である。この酵素は、ウリジンの合成に必要である。この株はウリジンを欠く培地で増殖できない。このプラスミドは、選択マーカー、すなわちOMPデカルボキシラーゼの遺伝子をコードする配列を含む。それゆえ、アスペルギルスによる該プラスミドの取り込みは、ウリジンを欠く培地上で増殖させることによって選択することができる。アスペルギルスは、ウリジン欠失培地上で増殖できるように該プラスミドにより形質転換される。

本発明の一つの態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリントランバク質が製造される。この方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列およびリンカー配列を合成することを包含する。その後、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化する。ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部

位に挿入し、ついで真核細胞をラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで形質転換する。

本発明の方法に使用する選択マーカー遺伝子は、ラクトフェリンcDNAプラスミドで形質転換された細胞の単離を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、選択マーカー遺伝子は、*pyr4*、*pyrG*、*argB*、*trpC*および*andS*から選ばれる。

本発明において有用なプロモーターは、ラクトフェリンcDNAの転写を制御することができるといえるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、プロモーターはアルコールデヒドロゲナーゼ、*argB*、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼよりなる群から選ばれる。

本発明において有用な転写停止配列は、ラクトフェリンmRNAの安定化を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、転写停止配列は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼまたは*benA*に由来するものである。

本発明において有用なリンカー配列は、翻訳開始コドン、分泌シグナルおよび制限酵素開裂部位を含むものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、リンカー要素は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼまたはラクトフェリンに由来するものである。

本発明において有用な真核細胞は、ラクトフェリンcDNAを含むプラスミドを組み込むことができ、ラクトフェリンcDNAを発現することができるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、真核細胞は真菌細胞または昆虫細胞である。SF9などの昆虫細胞が本発明の方法に有用である。さらに好ましくは、真菌細胞は酵母細胞である。最も好ましくは、本発明において有用な真核細胞は、*Aspergillus*・オリゼー、*Aspergillus*・ニガー、*Aspergillus*・ニデウランス (*A. nidulans*) および *Aspergillus*・アワモリ (*A. awamori*) などの *Aspergillus* 株である。

本明細書には本発明の目的を達成するための具体例について開示しているが、本発明の精神および範囲を逸脱しない範囲において方法および装置を若干改変し

【 图 2 】

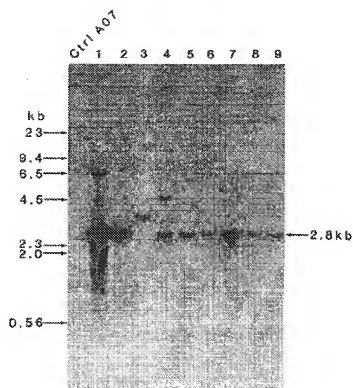


FIG. 2

【 图 3 A 】

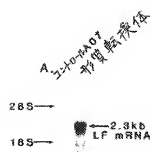


FIG. 3A

【図3B】

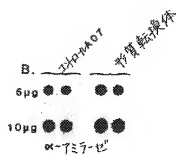


FIG. 3B

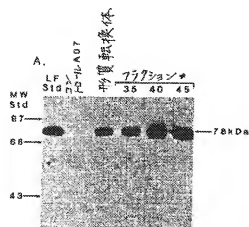
【図3C】



FIG. 3C

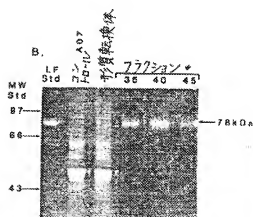
【図4A】

FIG. 4A



【図4B】

FIG. 4B



【図4C】



FIG. 4C

【図5A】

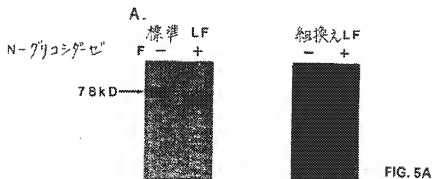


FIG. 5A

【図5B】

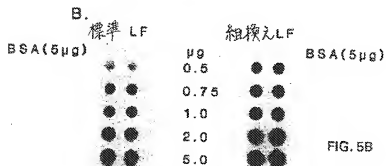


FIG. 5B

【図6】

cDNA SEQUENCE AND AMINO ACID SEQUENCE
OF HUMAN LACTOFERRIN

1
GAATTC CACCGCAGAC

18
ATG AAA CTT GTC TTC CTC GTC CTG CTC TTC CTC GGG GCG CTC GGA CTG
met lys leu val phe leu val leu leu phe leu gly ala leu gly leu

1
66
TGT CTG CCT GCG CGT AGG AGA AGG AGT GTT CAG TGG TGC ACC GTA TCC
cys leu ala gly arg arg arg ser val gln trp cys thr val ser

17
114
CAA CCG GAG GCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATC AGA AGA
gln pro glu ala thr lys cys phe gln trp gln arg asn met arg arg

33
162
CTG CGT GCG CCT CCT GTC AGC TGC ATA AAG AGA GAC TCC CCC ATC CAG
val arg gly pro pro val ser cys ile lys arg asp ser pro ile gln

49
210
TGT ATC CAG GCC ATT GCG GAA AAC AGG GCG GAT GCT CTG ACC CTT GAT
cys ile gln ala ile ala glu asn arg ala asp ala val thr leu asp

65
258
GCT GGT TTC ATA TAC CAG GCA GGC CTG GCC CCC TAC AAA CTG CGA CCT
gly gly phe ile tyr glu ala gly leu ala pro tyr lys leu arg pro

81
306
CTA CCG CCG GAA CTC TAC GGC ACC GAA AGA CAG CCA CGA ACT CAC TAT
val ala ala glu val tyr gly thr glu arg gln pro arg thr his tyr

97
354
TAT CCG GTG GCT GTG GTG AAG AAG GGC GGC AGC TTT CAG CTG AAC GAA
tyr ala val ala val val lys lys gly gly ser phe gln leu asn glu

113
402
CTG CAA GGT CTG AAG TCC TGC CAC ACA GGC CTT CCG AGG ACC GCT GGA
leu gln gly leu lys ser cys his thr gly leu arg arg thr ala gly

129
450
TGG AAT GTG CCT ATA GCG ACA CTT CCT CCA TTC TTG AAT TGG ACC GGT
trp asn val pro ile gly thr leu arg pro phe leu asn trp thr gly

145

Sheet 1 of 4

FIGURE 6

【図6】

498
 CCA CCT GAG CCG ATT GAG GCA GCT GTG GCC AGG TTC TTC TCA SCC ACC
 pro pro glu pro ile glu ala ala val ala arg phe phe ser ala ser
 161
 546
 TGT GTT CCC GGT CCA GAT AAA CGA CAG TTC CCC AAC CTG TGT CGC CTG
 cys val pro gly ala asp lys gly gln phe pro asn leu cys arg leu
 177
 594
 TGT GCG GGG ACA GGG GAA AAC AAA TGT GCC TTC TCC TCC CAG GAA CCG
 cys ala gly thr gly glu asn lys cys ala phe ser ser gln glu pro
 193
 642
 TAC TTC AGC TAC TCT GGT GCC TTC AAG TGT CTG AGA GAC GGG GCT GGA
 tyr phe ser tyr ser gly ala phe lys cys leu arg asp gly ala gly
 209
 690
 GAC GTG GCT TTT ATC AGA GAG AGC ACA GTG TTT GAG GAC CTG TCA GAC
 asp val ala phe ile arg glu ser thr val phe glu asp leu ser asp
 225
 738
 GAG GGT GAA AGG GAC GAG TAT GAG TTA CTC TGC CCA GAC AAC ACT CGC
 glu ala glu arg asp glu tyr glu leu leu cys pro asp asn thr arg
 241
 786
 AAG CCA GTG GAC AAG TTC AAA GAC TGC CAT CTG GCG CGG GTC CCT TCT
 lys pro val asp lys phe lys asp cys his leu ala arg val pro ser
 257
 834
 CAT GCC GTT GTG GCA CGA AGT GTG AAT GGC AAG GAG GAT GCC ATC TGG
 his ala val val ala arg ser val asn gly lys glu asp ala ile trp
 273
 882
 AAT CTT CTC CGC CAG GCA CAG GAA AAG TTT GGA AAG GAC AAG TCA CCG
 asn leu leu arg gln ala gln gln lys phe gly lys asp lys ser pro
 289
 930
 AAA TTC CAG CTC TTT GGC TCC CCT AGT GGG CAG AAA GAT CTG CTG TTC
 lys phe gln leu phe gly ser pro ser gly gln lys asp leu leu phe
 305
 978
 AAG GAC TCT GCC ATT GGG TTT TCG AGG GTG CCC CCG AGG ATA GAT TCT
 lys asp ser ala ile gly phe ser arg val pro pro arg ile asp ser
 321
 1026
 GCG CTG TAC CTT GGC TCC GGC TAC TTC ACT GGC ATC CAG AAC TTG AGC
 gly leu tyr leu gly ser gly tyr phe thr ala ile gln asn leu arg
 337

【図6】

1074
AAA AGT GAG GAG GAA GTG CCT GCC CGG CGT GCG CGG GTC GTG TGG TCT
lys ser glu glu glu val ala ala arg arg ala arg val val trp cys
353

1122
GCG GTC GCG GAG CAG GAG CTG CGC AAG TGT AAC CAG TCG ACT GCG TTC
ala val gly glu gln glu leu arg lys cys asn gln trp ser gly leu
369

1170
AGC GAA GGC AGC GTG ACC TGC TCC TCG GCC TCC ACC ACA CAG CAC TGC
ser glu gly ser val thr cys ser ser ala ser thr thr glu asp cys
385

1218
ATC GCC CTG GTG CTG AAA GGA GAA GCT GAT GCC ATG AGT TTG GAT GGA
ile ala leu val leu lys gly glu ala asp ala met ser leu asp gly
401

1266
GGA TAT GTG TAC ACT GCA GGC AAA TCT GCT TTG GTG CCT CTC GTG GCA
gly tyr val tyr thr ala gly lys cys gly leu val pro val leu ala
417

1314
GAG AAC TAC AAA TCC CAA CAA AGC AGT GAC CCT GAT CCT AAC TCT GTG
glu asn tyr lys ser gln gln ser ser asp pro asp pro asn cys val
433

1362
GAT AGA CCT GTG GAA GGA TAT CTT GCT GTG GCG GTG GTT AGG AGA TCA
asp arg pro val glu gly tyr leu ala val ala val val arg arg ser
449

1410
GAC ACT AGC CTT ACC TGG AAC TCT GTG AAA GGC AAG AAG TCC TGC CAC
asp thr ser leu thr trp asn ser val lys gly lys lys ser cys his
465

1458
ACC GCC GTG GAC AGG ACT GCA GGC TGG AAT ATC CCC ATG GCC CTG CTC
thr ala val asp arg thr ala gly trp asn ile pro met gly leu leu
481

1506
TTC AAC CAG ACG GGC TCC TCC AAA TTT GAT GAA IAT TTC AGT CAA AGC
phe asn gln thr gly ser cys lys phe asp glu tyr phe ser gln ser
497

1554
TGT GCC CTT GGG TCT GAC CCG AGA TCT AAT CTC TGT GCT CTG TGT ATT
cys ala pro gly ser asp pro arg ser asn leu cys ala leu cys ile
513

1602
GCC GAC GAG CAG GGT GAG AAT AAG TGC CTG CCC AAC ACC AAT GAG AGA
gly asp glu gln gly glu asn lys cys val pro asn ser asn glu arg
529

【図6】

1650
TAC TAC GGC TAC ACT GGC GCT TTC CGG TGC CTC CCT GAG AAT GCT GGA
tyr tyr gly tyr thr gly ala phe arg cys leu ala glu asn ala gly
545

1698
GAC GTT GCA TTT GTG AAA GAT GTC ACT GTC TTG CAG AAC ACT GAT GGA
asp val ala phe val lys asp val thr val leu gin asn thr asp gly
561

1746
AAT AAC AAT GAG GCA TGG GCT AAG GAT TTG AAG CTG GCA GAC TTT GCG
asn asn asn glu ala trp ala lys asp leu lys leu ala asp phe ala
577

1794
CTG CTG TGC CTC GAT GGC AAA CGG AAG CCT GTG ACT GAG GCT AGA ACC
leu leu cys leu asp gly lys arg lys pro val thr glu ala arg ser
593

1842
TSC CAT CTT GCC ATG GCC CGG AAT CAT GCC GTG GTG TGT CGG ATG GAT
cys his leu ala met ala pro asn his ala val val ser arg met asp
609

1890
AAG GTG GAA CGC CTG AAA CAG GTG CTG CTC CAC CAA CAG GCT AAA TTT
lys val glu arg leu lys gln val leu leu his gln gln ala lys phe
625

1938
GGG AGA AAT GGA TCT GAC TGC CCG GAC AAG TTT TGC TTA TTC GAG TCT
gly arg asn gly ser asp cys pro asp lys phe cys leu phe gln ser
641

1986
GAA ACC AAA AAC CTT CTG TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG GCC AGA
glu thr lys asn leu leu phe asn asp asn thr glu cys leu ala arg
657

2034
CTC CAT GGC AAA ACA ACA TAT GAA AAA TAT TTG GGA CCA CAG TAT GTC
leu his gly lys thr thr tyr glu lys tyr leu gly pro gln tyr val
673

2082
GCA GGC ATT ACT AAT CTG AAA AAG TGC TGA ACC TCC CCC CTC CTG GAA
ala gly ile thr asn leu lys lys cys ser thr ser pro leu leu glu
689

2130
GCC TGT GAA TTC CTC AGG AAG TAA
ala cys glu phe leu arg lys *** ACCCAA CAAGATGCCC CAGCTCCCGA
705

2180
AGAAAGCCCTC AGCCATTCAC TCCCGCCGAGC TCTTCTCCCC AGGTGTGTG GGGCCTTGGC

2240
TCCGCTGCTG AAGGTGGGGA TTGCCCATCC ATCTGCTTAC AATTCCTGCG TGTCGTCTTA

2300
GCAAGAGTA AAATGAGAAA TTTTGTGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/US93/03614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC(C) : C07K 15/06, 15/14, C12N 5/04, 13/06, 15/10, 15/12
 US CL : 536/23.5, 530/350, 394, 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.5, 530/350, 394, 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG, Swissprot, PIR, search terms: lactoferrin, amylase, oryzae, aspergillus, cDNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Biochemical Journal, Volume 276, issued June 1991, Stowell et al., "Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells", pages 349-355, see especially p. 350, column 2.	<u>1, 3, 4, 8, 10, 11, 13,</u> <u>16-18, 21</u> 1-21
Y	WC, A, 89/01969 (Woldike, H.F.) 09 March 1989, see whole publication, especially pages 3, 5, 6, 10 and 11.	1-21
Y	Gene, Volume 79, issued 1989, Gines et al., "Aspergillus oryzae has two nearly identical Taka-amylase genes, each containing eight introns", pages 107-117, see especially the abstract and Figures 2 and 3.	1-21
Y	Journal of Molecular Biology, Volume 173, issued 1984, G. von Heijne, "How signal sequences maintain cleavage specificity", pages 243-251, see especially page 244.	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family entries.

* Special categories of cited documents:	**	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant's intention to substantiate the principle or theory underlying the invention
"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular reference	**	document of particular relevance; the claimed invention may be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account
"B" earlier documents published on or after the international filing date	**	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in view of or more other cited documents, such as documents lacking relevance to a person skilled in the art
"C" documents which may show doubts or provide hints or which at least to a certain extent indicate the existence of a problem or other special reason (as specified)	**	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in view of or more other cited documents, such as documents lacking relevance to a person skilled in the art
"D" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	**	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in view of or more other cited documents, such as documents lacking relevance to a person skilled in the art
"E" documents published prior to the international filing date but later than the priority date (divulged)	**	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in view of or more other cited documents, such as documents lacking relevance to a person skilled in the art

Date of the actual completion of the international search

27 May 1993

Date of mailing of the international search report

27 JUL 1993

 Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20531

Authorized officer

KEITH C. FURMAN, PH.D.

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992:en

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/03614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nucleic Acids Research, Volume 18, Number 13, issued 1990, Powell <i>et al.</i> , "Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA", page 4013.	1-21
Y	Lipids, Volume 24, Number 9, issued 1989, Hugo-Jensen <i>et al.</i> , " <i>Rhizomucor miehei</i> triglyceride lipase is processed and secreted from transformed <i>Aspergillus oryzae</i> ", pages 781-785, see especially the abstract.	1-21
Y	US, A, 4,740,461 (Kaufman) 26 April 1988, see whole patent, especially Table 1 and columns 11 and 12.	1-21
Y,P	US, A, 5,155,037 (Summers) 13 October 1992, filed 04 August 1989, see whole patent, especially columns 1 and 4-8.	1, 3, 8, 10, 11, 12, 16-18, 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 5/10			
15/09			
//(C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:66)			
(C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			
			//(C 1 2 N 5/00
			C 1 2 R 1:91)
			A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AT, AU, BB, BG, B R, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, S E, SK

(72)発明者 オマリー、バート・ダブリュー
 アメリカ合衆国77079テキサス、ヒュース
 トン、ランブルウット639番

(72)発明者 メイ、グレゴリー・エス
 アメリカ合衆国77025テキサス、ヒュース
 トン、ダーネス4119番